

# Biotossine algali in molluschi bivalvi: risultati di 5 anni di monitoraggio nel periodo di passaggio tra prova biologica e metodo chimico

L. Bille<sup>1\*</sup>, M. Toson<sup>1</sup>, L. Contiero<sup>1</sup>, P. F. Arcangeli<sup>1</sup>, G. Cester<sup>1</sup>, M. Danu Fozza<sup>1</sup>, Gallocchio<sup>1</sup>, P. Bordin<sup>1</sup>, R. Angeletti<sup>1</sup>, G.

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

<sup>2</sup> Azienda Sanitaria Locale (ASL) – (RO)

<sup>3</sup> Regione Veneto - Sezione Veterinaria e sicurezza alimentare – Venezia

**Keywords:** Biotossine algali, Molluschi bivalvi, MBA, LC-MS/MS

## Introduzione

L'Italia è il terzo produttore europeo di molluschi bivalvi e il Veneto si pone al secondo posto a livello nazionale per la produzione di mitili. Il nord Adriatico negli ultimi anni si è mostrato particolarmente sensibile ad accumulo di tossine algali con conseguenti sospensioni della raccolta dei molluschi. Mentre la presenza di acido domoico (ASP) e saxitossine (PSP) non è mai stata segnalata, il fenomeno dell'accumulo di tossine lipofile (DSP) è stato costantemente presente, causando, oltre che un rischio per la salute pubblica, seri danni economici per i produttori.

La normativa europea [1] prevede il monitoraggio delle zone di produzione di molluschi bivalvi per assicurare il rispetto dei parametri biotossicologici previsti dai Reg. CE 853/04 [2] e 786/2013 [3]. Quest'ultimo regolamento ha portato il limite normativo per Yessotossine da 1 a 3,75 mg di equivalente yessotossine/kg. Con il Reg. (CE) 15/2011 [4] la Commissione Europea ha identificato il metodo EU-RL LC-MS/MS (cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem) quale test ufficiale per la ricerca di tossine marine lipofile, in sostituzione della prova biologica (Mouse Bio Assay, MBA) precedentemente utilizzata e ancora in uso solo per la ricerca delle PSP. Lo scopo del presente lavoro è di valutare i risultati del piano di monitoraggio per la presenza di biotossine algali in molluschi bivalvi raccolti nella regione Veneto nel periodo compreso tra il 2010 e il 2014, anche alla luce del cambiamento portato dall'adozione del metodo chimico accreditato secondo UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 per la ricerca delle DSP, con inoltre un focus su una zona di produzione del Polesine risultata particolarmente colpita dal fenomeno nel periodo considerato.

## Summary

Italy is the third European producer of marine molluscs and the Veneto Region is a leader in the national shellfish industry. While hydrophilic biotoxins as domoic acid (ASP) and saxitoxins (PSP) have never been detected so far in this area, the phenomenon of lipophilic toxins accumulation in shellfish has become more and more frequent in the recent years. To protect public health the European Union established a series of regulations for the control of lipophilic toxins. Thus, Regulation (EC) N° 853/2004 and subsequent amendments lays down the maximum levels for lipophilic toxins in bivalve molluscs.

In this work, results of the analysis of more than 4000 samples of shellfish tissue collected in the period 2010-2014 are presented and discussed taking into account the changes brought by the introduction the EU-RL LC-MS/MS (Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry) method in 2012 as the reference method for the detection of lipophilic toxins instead of the MBA previously in use.

## Materiali e metodi

Durante il periodo compreso tra gennaio 2010 e dicembre 2014, nell'ambito delle attività di monitoraggio igienico sanitario delle zone di produzione di molluschi bivalvi nelle lagune e tratti marino costieri di competenza della Regione Veneto, sono stati raccolti dal personale dei Servizi Veterinari delle Aziende ULSS più di 4000 campioni su cui verificare l'eventuale presenza di acido domoico (ASP), saxitossine (PSP) e tossine lipofile (DSP). Fino a luglio 2012, per tutte e tre le tipologie di tossine era utilizzato il mouse bioassay (MBA), in quanto metodica ufficialmente riconosciuta. Nel periodo successivo tale metodica è rimasta in uso solo per le PSP mentre per le ASP è stato introdotto il metodo 2006.02 ASP ELISA (come previsto dal Reg. CE 244/2007) e per le DSP il metodo EU-RL LC-MS/MS.

## Risultati e discussione

Nel periodo considerato sono stati sottoposti alla ricerca delle tossine PSP, ASP e DSP complessivamente 4567 campioni. La specie maggiormente testata, in quanto considerata particolarmente a rischio di accumulo, è stata il mitilo (80%); a seguire vongola verace (7%), vongola o lupino (3%), fasolaro (2%), canestrello (21%) e altre specie (6%). Il numero di campioni analizzati per anno è più che raddoppiato nel 2011 rispetto all'anno precedente, passando da ~400 a ~1000 e mantenendosi stabile negli anni successivi. Tale aumento registrato dal 2011 è da attribuirsi ad un'intensificazione delle attività di monitoraggio reso possibile dall'adozione di una procedura sperimentale di campionamento al punto di sbarco, e messo in atto dai Servizi Veterinari Veneti in conseguenza al grave episodio di intossicazione alimentare che ha coinvolto circa 150 persone, causato dal

consumo di mitili contaminati da acido okadaico provenienti da alcuni allevamenti del Golfo di Trieste. Nessuna non conformità è mai stata riscontrata nel periodo in esame per PSP e ASP, mentre circa il 5% del totale dei campioni analizzati è risultato non conforme per DSP, il 96% dei quali apparteneva alla specie mitilo.

Mettendo a confronto i dati relativi al periodo 2010-2012 in cui la ricerca delle tossine DSP veniva svolta con il MBA (numero campioni=1792) con quello successivo all'adozione del metodo chimico (numero campioni =2775), la percentuale di campioni non conformi è passata rispettivamente dal 10% all'1%; ciò potrebbe essere legato alle migliori performance della cromatografia liquida rispetto al saggio biologico, il quale è risaputo dare, con una certa frequenza, esiti falsi non conformi, soprattutto in presenza di altre tossine peraltro non tossiche per l'uomo [5]. Una valutazione in relazione alla tipologia di tossine riscontrate può essere effettuata solo in riferimento ai campioni analizzati con il metodo chimico, in quanto l'MBA è un test aspecifico, non in grado di dare informazioni sulla molecola presente; le non conformità riscontrate dopo l'adozione di tale metodo sono state nel 94% dei casi (n=29) per yessotossine e nel 6% per acido okadaico (n=2). In riferimento alle specie interessate dall'accumulo di tossine, mentre con l'utilizzo del MBA una piccola percentuale (4%) dei campioni non conformi interessava altre specie (canestrello, ostrica concava e vongola verace), con il metodo chimico le non conformità sono state rilevate solo in campioni di mitili.

Nel periodo in cui veniva utilizzato il MBA gli episodi di accumulo di tossine, anche se in diversa misura, hanno visto coinvolta buona parte delle zone di produzione venete. Dopo l'adozione del metodo chimico invece, il fenomeno è stato accertato quasi esclusivamente nelle zone di produzione a mare e in particolare in quelle antistanti il delta del Po, area in cui peraltro erano state riscontrate il maggior numero di non conformità anche con il MBA. Allo scopo di studiare l'andamento temporale del fenomeno sono stati valutati i risultati relativi ad una zona di produzione del Polesine situata tra la foce del Po di Pila e quella del Po di Goro, nella quale nel quinquennio considerato, sono state riscontrate un numero rilevante di non conformità sia con l'MBA che con il metodo chimico. In generale, in tale periodo, il maggior numero di campioni con superamento dei limiti di legge per tossine DSP (yessotossine con metodo chimico) è stato rilevato in autunno, portando a volte alla chiusura degli allevamenti interessati fino alla primavera successiva. Ciò potrebbe essere dovuto alla diminuzione della capacità dei mitili di depurarsi durante l'inverno dalle tossine accumulate in autunno dovuta alla scarsa presenza di fitoplancton e alle basse temperature [6]. Contrariamente agli altri anni, durante il 2013 non sono state rilevate non conformità in questa specifica zona. Apparentemente ciò avrebbe potuto essere spiegato semplicemente dall'aumento del relativo limite apportato dal Reg. CE 786/2013. A una più attenta valutazione dei dati si evince però che sia nel 2012 che nel 2014, i livelli di yessotossine riscontrati hanno raggiunto e superato anche il limite di 3.75 mg di equivalente yessotossine/kg previsto dalla normativa comunitaria entrata in vigore nel 2013. L'analisi dei dati relativi ai controlli svolti sull'acqua campionata contestualmente ai molluschi al fine dell'identificazione di specie fitoplanctoniche potenzialmente tossiche, mostra come nel 2013, contrariamente agli altri anni in esame, il riscontro di *Lingulodinium polyedrum*, *Protoceratium reticulatum* e *Gonyaulax spinifera*, specie che possono produrre yessotossine, sia stato pressoché nullo.

In conclusione, l'adozione del metodo chimico per la ricerca delle biotossine algali DSP ha costituito sicuramente un importante passo avanti per ottenere dati molto affidabili a maggior garanzia della sicurezza del consumatore. Inoltre i dati quantitativi e relativi al tipo di tossina presente nei molluschi ottenuti mediante LC-MS/MS, permetteranno nel prossimo futuro di analizzare meglio le dinamiche di accumulo delle biotossine nei bivalvi e l'eventuale esistenza di una correlazione con la presenza di specie fitoplanctoniche potenzialmente tossiche.

## Bibliografia

[1] EU Council. (2004). Regulation (EC) No 854/2004 of the European parliament and of the council of 29th April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls of products of animal origin intended for human consumption. Official Journal of the European Union, Series, L 226, 83e127, 25.06.04.

Arial 8

[2] EU Council. (2004). Regulation (EC) No 853/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Official Journal of the European Communities, Series L, 139, 55e205. [http://europa.eu.int/eurlex/pri/de/oj/dat/2004/l\\_139/l\\_13920040430de00550205.pdf](http://europa.eu.int/eurlex/pri/de/oj/dat/2004/l_139/l_13920040430de00550205.pdf), 30.4.04.

[3] EU Commission. (2013) Commission Regulation (Eu) No 786/2013 of 16 August 2013 amending Annex III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the permitted limits of yessotoxins in live bivalve molluscs. Official Journal of the European Union. Series L. 220, 14

[4] EU Commission. (2011) Commission Regulation (Eu) No 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs. Official Journal of the European Union. Series L. 6, 3

[5] Gerssen A., Mulder P.P.J., McElhinney M.A., De Boer J. (2009) Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 1421–1430

[6] Naustvoll L. J., Gustad E., Dahl E. (2012) Monitoring of Dinophysis species and diarrhetic shellfish toxins in Flødevigen Bay, Norway: inter-annual variability over a 25-year time-series. Food Additives & Contaminants: Part A. Vol. 29, No. 10, October 2012, 1605–1615